

WPLYW KADMU (II) NA NATLENIANIE PODŁOŻA I WZROST BIOMASY *AZOLLA CAROLINIANA* WILLD

R.P. Bennicelli¹, Z. Stępniewska^{1,2}, K. Szajnocha¹, A. Banach¹

¹Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, Katolicki Uniwersytet Lubelski
al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin
email: benniric@kul.lublin.pl

²Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-209 Lublin 27

Streszczenie. *Azolla caroliniana* Willd. jest paprocią wodną żyjącą w symbiozie z wiążącą azot atmosferyczny sinicą *Anabaena azollae*. Roślina ta od stuleci wykorzystywana jest w wielu krajach jako nawóz zielony, a od niedawna stała się obiektem badań dotyczących fitoremediacji.

Podczas 12 dniowej hodowli przeprowadzonej w warunkach laboratoryjnych, stwierdzono zdolność *Azolla* do natleniania podłoża zawierającego Cd(II) przy równoczesnym obniżeniu biomasy roślin wraz ze wzrostem stężenia metalu w pożywce.

Słowa kluczowe: *Azolla caroliniana* Willd, kadm (II), natlenianie.

WSTĘP

Azolla sp. żyje w symbiozie z sinicą, *Anabaena azollae*, która zamieszkuje w przestworach międzykomórkowych zlokalizowanych przy podstawie spodniej strony liści paproci [13].

Anabaena azollae udostępnia wytworzone związki azotowe swojemu gospodarzowi, dzięki czemu rozwija się on lepiej niż konkurencyjne rośliny pływające, uzależnione od dostępności azotu w kolumnie wody. *Azolla* dostarcza symbiontowi związków pokarmowych oraz zapewnia ochronę.

We wcześniejszych eksperymentach stwierdzono aktywny udział *Azolla* w pośredniczeniu natlenienia podłoża na głębokości jej ukorzenienia [11], także paproci rosnących na podłożu zanieczyszczonym Hg(II) [2] oraz optymalne dla produkcji biomasy wartości potencjału redoks, wynoszące od 550 do 600 mV [1].

Wiele przeprowadzonych do tej pory doświadczeń, których obiektem była *Azolla* sp. dotyczyło optymalnych warunków do jej rozwoju [6,8], wpływu paproci na fizyczne i chemiczne właściwości gleby wykorzystywanej rolniczo [7] oraz jej zastosowania do oczyszczania wód [3,4]. Niniejsza praca miała natomiast odpowiedzieć na pytanie, jak *Azolla caroliniana* Willd. rozwija się na podłożu zanieczyszczonym kadmem oraz jak wpływa obecność tego metalu na poziom natlenienia podłoża.

MATERIAŁY I METODY

Materiał roślinny (*Azolla caroliniana* Willd) użyty w eksperymencie pochodził z Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Warszawskiego.

Azolla była szczepiona w akwariach na pożywkę podstawowej, przygotowywanej wg zaleceń International Rice Research Institute (Tab.1.)

Tabela 1. Skład pożywki podstawowej według receptury IRRI [11]

Table 1. The composition of the nutrient solution according to IRRI [11]

Pierwiastek	Końcowe stężenie [mg·dm ⁻³]	Związek chemiczny
P	20,0	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O
K	40,0	K ₂ SO ₄
Ca	40,0	CaCl ₂ ·2H ₂ O
Mg	40,0	MgSO ₄ ·7H ₂ O
Mn	0,50	MnCl ₂ ·4H ₂ O
Mo	0,15	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
B	0,20	H ₃ BO ₃
Zn	0,01	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
Cu	0,01	CuSO ₄ ·5H ₂ O
Co	0,01	CoCl ₂ ·6H ₂ O
Fe	0,50	FeSO ₄ ·7H ₂ O
		EDTA·7H ₂ O

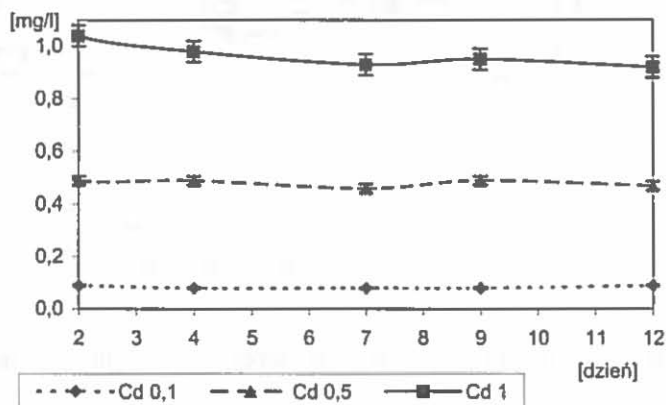
Zastosowana pożywka nie zawierała azotu tak, że paproć korzystała z azotu atmosferycznego wiązanego przez *Anabena azollae*. Podłoże zostało dodatkowo wzbogacone w środek przeciw glonowy (Algin firmy Tropical).

W czasie trwania 12 dniowego doświadczenia hodowano paproć w akwariach wypełnionych pożywkami o różnym składzie: pożywka podstawowa, pożywka podstawowa zawierająca 0,1; 0,5 oraz 1 mg·dm⁻³ Cd(II).

Badania przeprowadzono w kontrolowanych warunkach oświetlenia (16/8), temperatury powietrza (24-26°C) oraz temperatury podłoża (23-25°C). Wykonano następujące pomiary podłoża: pH (elektrometrycznie), Eh (według metody opisanej przez Glińskiego i Stępniewskiego [5]), ODR (według metody opisanej przez Lemona i Ericksona [9], zmodyfikowanej przez Malickiego i Walczaka [10]). Zawartość kadmu w pożywce kontrolowano metodą AAS, a po zakończeniu eksperymentu określono przyrost biomasy *Azolla*.

WYNIKI I DYSKUSJA

Rysunki 1-4 pokazują wyniki przeprowadzonych pomiarów: pH, Eh, ODR oraz przyrost biomasy *Azolla*.



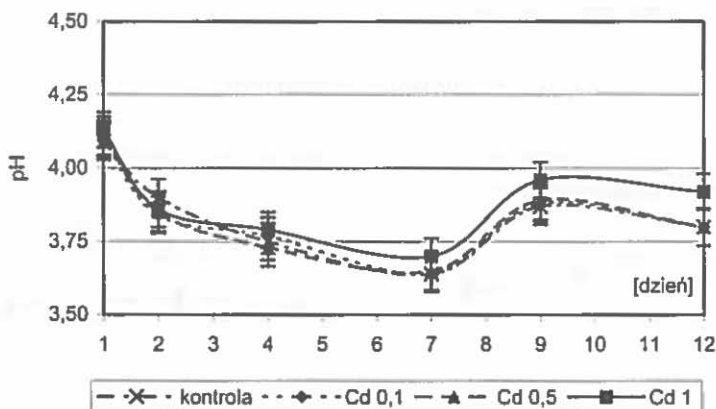
Rys. 1. Stężenia Cd(II) w pożywce różnych kombinacji w obecności *Azolla caroliniana* Willd.

Fig. 1. Change of Cd(II) concentration of nutrient solution in different regimes in the presence of *Azolla caroliniana* Willd.

Porównując przebieg zmienności odczynu podłoża w badanych kombinacjach zauważono, że dodatek soli kadmu nie wpłynął znacząco na odczyn podłoża. Wartość pH początkowo obniżyła się w czasie trwania doświadczenia w akwarium kontrolnym z 4,09 do 3,64 jednostki, a następnie podwyższyła się do 3,80. Odczyn podłoża w pozostałych akwariach również podlegał podobnym fluktuacjom (Tab. 2., Rys. 2.).

Tabela 2. Zmiany (Δ) parametrów podłoża w różnych kombinacjachTable 2. Changes (Δ) of the measured parameters at different regimes

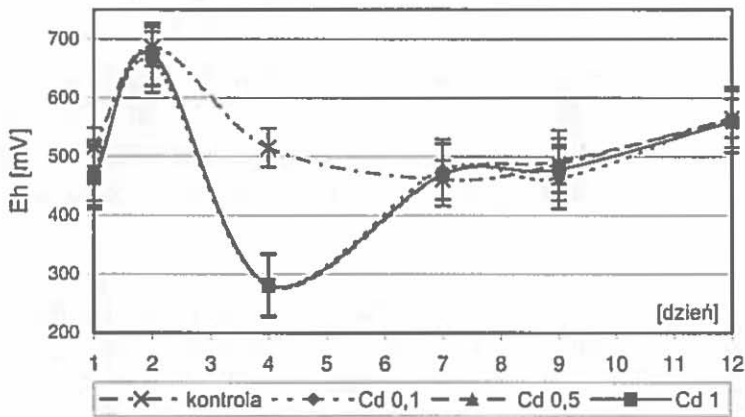
Kombinacja	Δ pH	Δ Eh [mV]	Δ ODR [$\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]
Kontrola	-0,29	49,25	6,65
Cd 0,1 ppm	-0,30	90,60	9,87
Cd 0,5 ppm	-0,31	91,83	22,03
Cd 1 ppm	-0,21	95,93	10,10

Rys. 2. Zmiany odczynu (pH) w pożywce różnych kombinacji w obecności *Azolla caroliniana* Willd.Fig. 2. Change of the reaction (pH) of the nutrient solution in different regimes in the presence of *Azolla caroliniana* Willd.

W trakcie eksperymentu potencjał oksydoredukcyjny podłoża akwarium kontrolnego nieznacznie wzrósł o 49,25 mV. Drugiego dnia pomiarowego zaobserwowano wartość maksymalną wynoszącą 686,9 mV, a następnie zanotowano spadek wartości omawianego parametru do 516 mV. Dziewiątego i dwunastego dnia miał miejsce stopniowy wzrost potencjału oksydoredukcyjnego do wartości 567 mV.

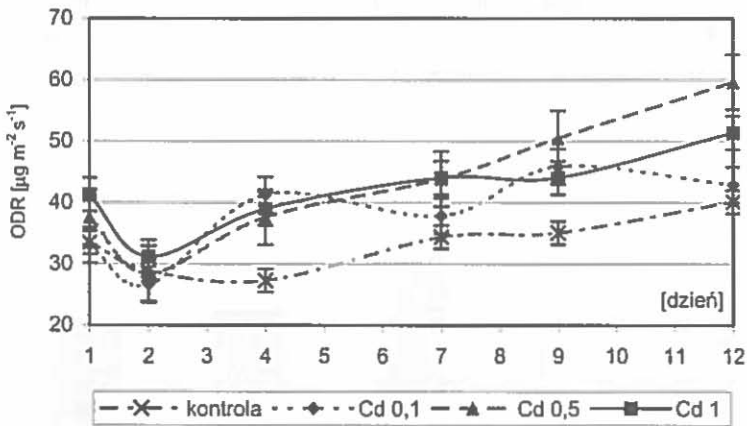
W akwariach wzbogaconych kadmem przebieg zmian Eh był zbliżony do kontrolnego z wyjątkiem dnia czwartego, kiedy to zmierzone wartości były znacznie niższe niż w akwarium kontrolnym (Rys. 3).

Natężenie dyfuzji tlenu (ODR), opisujące stopień natlenienia podłoża w kombinacji kontrolnej ogólnie wzrosło z 33,5 do 40,2 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, choć w ciągu pierwszych czterech dni zaobserwowano tendencję spadkową, a czwartego dnia osiągnęło minimum wynoszące 27,3 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Rys. 4).



Rys. 3. Zmiany potencjału redoks (Eh) w pożywce różnych kombinacji w obecności *Azolla caroliniana* Willd.

Fig. 3. Change of the redox potential (Eh) of nutrient solution in different regimes in the presence of *Azolla caroliniana* Willd.



Rys. 4. Zmiany natężenia dyfuzji tlenu (ODR) w pożywce różnych kombinacji w obecności *Azolla caroliniana* Willd.

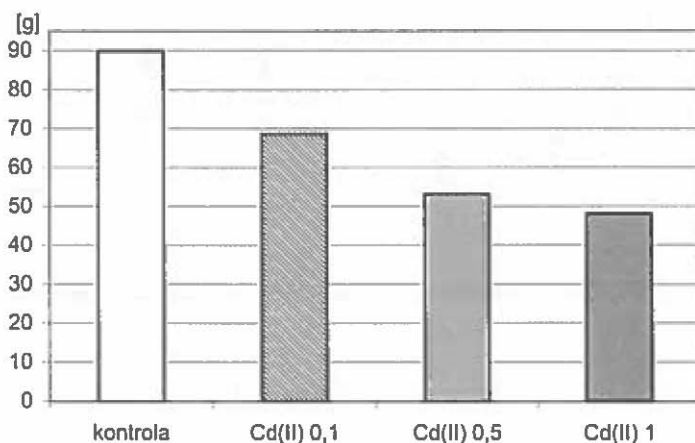
Fig. 4. Changes of the oxygen diffusion rate (ODR) of nutrient solution in different regimes in the presence of *Azolla caroliniana* Willd.

W pozostałych kombinacjach wartości ODR znacznie odbiegały od kontrolnych, gdyż tylko na początku doświadczenia (pierwszy i drugi dzień) były zbliżone. W późniejszym okresie podłoża w tych akwariach wykazywały zdecydowanie wyższe natlenienie. Było ono najwyższe w kombinacji zawierającej $0,5 \text{ mg-dm}^{-3}$ Cd(II) w podłożu i w stosunku do warunków kontrolnych wyższe pod koniec eksperymentu o 48%. Podobnie wysoki poziom natlenienia podłoża utrzymywał się do 7 dnia hodowli w kombinacji z 1 mg-dm^{-3} Cd(II), po czym wykazywał już słabszą tendencję wzrostową.

Poziom kadmu w pożywkach nie wykazywał gwałtownego spadku. Z upływem czasu obserwowano jego stopniowy ubytek z roztworu (Rys. 1) wynoszący odpowiednio dla kombinacji 0,1; 0,5; 1 mg-dm^{-3} : 10, 6 i 9% stężenia wyjściowego.

Wzrost biomasy *Azolla* uzależniony był od zawartości kadmu w pożywce. Największy przyrost odnotowano w akwarium kontrolnym, w którym w analizowanym okresie nastąpił ponad czterokrotny wzrost masy. Rośliny hodowane na pożywce podstawowej były ciemnozielone i dobrze rozwinięte.

Dodatek kadmu negatywnie, ale niejednakowo wpłynął na rozwój paproci (Rys. 5). W kombinacji $0,1 \text{ mg-dm}^{-3}$ Cd(II) siódmego dnia doświadczeń zauważono pojawienie się czerwonego zabarwienia na brzegach liści, a następnie ich zasychanie. Rośliny hodowane na pożywce z dodatkiem 0,5 i 1 mg-dm^{-3} kadmu charakteryzowały się pomarańczowożółtym zabarwieniem oraz zasychaniem rozety liści od zewnątrz.



Rys. 5. Redukcja biomasy *Azolla caroliniana* Willd. przy różnym stężeniu Cd(II).

Fig. 5. The biomass reduction of *Azolla caroliniana* Willd. at different concentration of Cd(II).

Stwierdzono również obniżenie biomasy *Azolla* przy wzrastającym poziomie Cd(II) w podłożu. Stanowiła ona odpowiednio, przy wzbogaceniu pożywki o 0,1; 0,5; 1 mg·dm⁻³ metalu: 76,37; 59,16; 53,52% biomasy paproci hodowanej na podłożu kontrolnym.

Hodowla *Azolla* w roztworze zawierającym jony Cd(II) w stężeniu 0,5 i 1 mg·dm⁻³ pożywki spowodowała ich ubytek z podłoża średnio o 20%. Stwierdzone zmiany odczynu nie były większe niż 0,5 jednostki pH i wystąpiły w środkowej fazie hodowli, dotyczyły one zarówno kombinacji kontrolnej jak i wzbogaconej kadmem. Wartości Eh utrzymywały się na optymalnym dla wzrostu paproci poziomie, wynoszącym 500-600 mV z wyraźnym, sięgającym 300 mV minimum, przypadającym na 4 dobę hodowli przy 1 mg·dm⁻³ Cd. Jednocześnie zaobserwowano znaczący wzrost natlenienia podłoża w porównaniu z akwariem kontrolnym, stymulowany obecnością jonów Cd, na który dotychczas nie zwrócono uwagi w pracach nad *Azolla*.

WNIOSKI

Po przeprowadzeniu 12 dniowej hodowli *Azolla caroliniana* Wild. na pożywkach: IRRI, IRRI z dodatkiem 0,1; 0,5; 1 mg·dm⁻³ Cd (II) sformułowano następujące wnioski:

1. Obecność Cd (II) w pożywce zredukowała przyrost biomasy paproci odpowiednio o 23,63%; 40,84%; 46,48% w porównaniu z kontrolą.
2. Obecność jonów Cd (II) stymulowała natlenienie pożywki przez *Azolla*, powodując 48% wzrost natężenia dyfuzji tlenu w podłożu.

PIŚMIENNICTWO

1. **Bennicelli R.P.:** Wpływ form azotu na potencjał redoks i wzrost biomasy *Azolla filiculoides* Lam. Acta Agrophysica, 38, 7-14, 2000.
2. **Bennicelli R.P., Stępniewska Z., Banach A., Szajnocha K.:** Wpływ rtęci (II) na warunki aeracyjne podłoża z udziałem *Azolla caroliniana* Willd. Acta Agrophysica, 84, 5-12, 2003.
3. **Forni C., Cascone A., Cozzolino S., Migliore.:** Drugs uptake and degradation by aquatic plants as a bioremediation technique. Minerva Biotecnologica, 13, 2, 151-152, 2001.
4. **Forni C., Chen J., Tancioni L., Grilli Caiola M.:** Evaluation of the fern *Azolla* for growth nitrogen and phosphorus removal from wastewater. Wat. Res., 35, 1592-1598, 2001.
5. **Gliński J., Stępniewski W.:** Soil Aeration and Its Role for Plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985.
6. **Hechler W. D. Dawson J. O.:** Factors affecting nitrogen fixation in *Azolla caroliniana*, Transactions of the Illinois State Academy of Science, 88, and 4, 97-107, 1995.

7. Kiguli N. L., The utilisation of *Azolla filiculoides* Lam. as a biofertiliser under dryland conditions. Rhodes University Electronic Theses Collection, M.Sc. (Botany)-Rhodes University, 2000.
8. Laurawiczenie T. W., Jakunin A. F., Gotow I. N.: Wpływ temperatury i fotoperiodu na wzrost i wiązanie azotu przez *Azolla*. *Fizjologia Rastieni*, 7, 3, 457-461, 1990.
9. Lemon E.R., Erickson A.E.: The measurement of oxygen diffusion in the soil with platinum microelectrode. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 16, 160-163, 1952.
10. Malicki M., Walczak R.: A gauge for redox potential and the oxygen rate in the soils with an automatic regulation of cathode potential. *Zesz Probl. Post. Nauk Roln.*, 220, 447-452, 1983.
11. Stępniewska Z., Bennicelli R.P.: Dynamika procesów oksydoredukcyjnych w pożywce i w osadzie z udziałem *Azolla caroliniana* Willd. *Acta Agrophysica*, 53, 159-164, 2001.
12. Watanabe I., Roger P.A., Landha, Van Hove C.: Biofertilizer Germoplasm Collections at IRRI, IRRI, Manila 1992.
13. Wołkowycki D.: *Azolla filiculoides* (Pteridophyta, Azollaceae) w Polsce. *Fragmenta Floristica et Geobotanica Series Polonica*, 6, 165-170, Kraków 1999.

INFLUENCE OF CADMIUM (II) ON THE ABILITY OF *AZOLLA*
CAROLINIANA WILLD TO AERATION OF NUTRITIVE SOLUTION
AND ON GROWING PLANTS

R. P. Bennicelli¹, Z. Stępniewska^{1,2}, K. Szajnocha¹, A. Banach¹

¹Department of Biochemistry and Environmental Chemistry, Catholic University of Lublin
al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin
email: benniric@kul.lublin.pl

²Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, ul. Doświadczalna 4, 20-209 Lublin 27

Abstract. *Azolla caroliniana* Willd. is a floating water fern living in symbiosis with blue-green algae *Anabaena azollae*, that fixes atmospheric nitrogen. *Azolla* plants are used for centuries as a nitrogen biofertilizer and stimulated many studies (for example on its ability to phytoremediation). During 12 days of the experiment at laboratory conditions, an active role by *Azolla caroliniana* Willd. in aerating of the nutritive solution containing Cd(II) and the decrease of biomass with the increase of Cd(II) concentration in solution was stated.

Key words: aeration, *Azolla caroliniana* Willd., Cd (II).